文章编号:1000-5404(2005)11-1165-04

论著

谷氨酰胺人体生物等效性评价研究

汤建林,周世文,应 懿,徐 颖,黄永平 (第三军医大学新桥医院国家药品临床研究基地,重庆 400037)

提 要: 目的 评价复方谷氨酰胺两种制剂中谷氨酰胺是否生物等效。**方法** 男性健康受试者24名,随机分成两组,交叉口服受试制剂和参比制剂各1.99 g,在一定时间点取静脉血分离血浆,用高效液相色谱紫外检测法测定人血浆中谷氨酰胺,所得数据经3P97处理得到主要药代动力学参数。**结果** 被试制剂与参比制剂谷氨酰胺的T_{max}分别为(1.65±0.63) h和(1.65±0.56) h,C_{max}分别为(63.83±14.60)μg/ml和(71.09±16.67)μg/ ml,用梯形法计算所得的AUC_{0-t}分别为(252.74±59.77)μg·h·ml^{-1}和(281.31±82.62)μg·h·ml^{-1}。对T_{max}和经对数转换后的C_{max},AUC_{0-t}进行方差分析和双单侧t检验及90%可信限判断,谷氨酰胺T_{max}落在参比制剂的85.7%~114.3%范围内,C_{max}落在参比制剂的81.4%~98.9%范围内,AUC_{0-t}落在参比制剂的84.7%~97.6%范围内,复方谷氨酰胺颗粒剂的相对生物利用度谷氨酰胺为93.0%±20.2%。**结论** 两制剂中谷氨酰胺生物等效。

关键词: 谷氨酰胺;生物等效性;HPLC;血浆
中图法分类号: R446.1; R944.5; R977.4 **文献标识码**: A

Experimental evaluation of the bioequivalence of glutamine in healthy male volunteers

TANG Jian-lin, ZHOU Shi-wen, YING Yi, XU Ying, HUANG Yong-ping (Base for Drug Clinical Trial, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To evaluate the bioequivalence of glutamine in two compound glutamine preparations. **Methods** A total of 24 healthy male volunteers, randomized into two groups, were administered with two preparations of compound glutamine respectively in an open randomized crossing test. A single oral dose of the tested preparations and reference preparations was 1.99 g. Venous blood of the subjects was collected for separation of blood plasma. Glutamine (GLN) concentrations in the plasma were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The pharmacokinetics parameters of GLN were obtained by using 3P97 software. **Results** GLN parameters of the tested and reference preparations were obtained. T_{max} of the tested preparations and reference preparations was (1.65±0.63) h and (1.65±0.56) h respectively, C_{max} (63.83±14.60) μg·ml^{-1} and (71.09±16.67) μg·ml^{-1}, AUC_{0-t} (252.74±59.77) μg·ml^{-1}·h^{-1} and (281.31±82.62) μg·ml^{-1}·h^{-1}. The statistical analysis showed that there was no significant difference between C_{max}, AUC_{0-t} and T_{max} of two preparations. The relative bioavailability of GLN was (93.0±20.2)%. **Conclusion** Glutamine in the two preparations was bioequivalent.

Key words: glutamine; bioequivalence; HPLC; blood plasma

复方谷氨酰胺颗粒剂是由谷氨酰胺和萘磺酸钠组成。L-谷氨酰胺是氨基酸的一种,为粘多糖类的组成成分,参与已糖胺的生物合成,具有促进粘蛋白的生物合成,以及保护和修复溃疡组织的效果。本品口服后经胃肠道吸收进入血液,临床具有治疗胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡等作用。复方谷氨酰胺颗粒剂最先由日本寿制药株式会社上市,商品名为麦滋林-S颗粒。随着专利保护期的结束,国内已开始对其仿制,并获国家食品药品监督管理局批准,开展人体生物等效性试验。试验在GCP指导原则下进行,试验方案经伦理委员会批准通过,获受试者知情同意。

1 材料与方法

1.1 试验药物

被试制剂:复方谷氨酰胺颗粒剂(每袋含谷氨酰胺0.663 g、萘磺酸钠2.1 mg),由重庆北碚现代应用药物研究所提供。批号:20011001。

参比制剂:麦滋林颗粒(每袋含谷氨酰胺0.67 g、萘磺酸钠2.1 mg),由日本寿制药株式会社生产。批号:20010321。

1.2 试验对象

健康男性受试者24名,年龄(20.83±1.17)岁。身高(171.25±6.32) cm,体质量(58.75±5.59) kg,受试者经病史询

作者简介:汤建林(1963-),男,湖南省浏阳市人,硕士,副研究员,主要从事药物分析、药代动力学及生物等效性方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68755311,E-mail: yljd@mail.tmmu.com.cn
通讯作者:周世文,电话:(023)68755311
收稿日期:2005-02-25;修回日期:2005-04-28

问,并经肝肾功能、血尿常规和心电图检查证实为健康者,志愿作为本试验受试者参加复方谷氨酰胺颗粒剂的人体生物利用度试验。受试者在1个月内未服用其它药物,并在规定试验期间不服用其它任何药物,不饮用茶、咖啡、酒和饮料。受试者在受试前签署受试者知情同意书。

1.3 给药方案

采用随机交叉试验方法进行试验设计,24名受试者完全随机分成两组,每组各12名。服药前禁食12 h,交叉分别口服被试制剂和参比制剂1.99 g(3袋),以温开水200 ml送服,3.5 h后统一用标准餐。由于食物对谷胺酰胺测定有影响,两次用餐标准及用餐时间间隔严格统一。试验期间禁烟酒茶等和其它药物。第1周期和第2周期两次给药间隔为7 d。

1.4 血样采集

受试者在服药前和服药后0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、8、10、12 h采集静脉血4 ml于肝素抗凝管中,分离得到血浆于-20 ℃冰箱储存,待测血药浓度。

1.5 仪器与试剂

1.5.1 仪器 Waters高效液相色谱系统、包括600E泵、7725i进样器、Waters Millennium32色谱工作站、Waters SymmetryC18柱(3.9 mm×150 mm,5 μm,NO.WATO46980)、德国Sartorins MC210s电子天平、美国ABBOTT公司高速离心机、80-2型低速离心机(上海手术器械厂)、DZ-88恒温真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂)、Millipore超纯水系统。

1.5.2 试剂 谷氨酰胺(GLN)对照品(纯度:99.6%,由北碚现代应用药物研究所提供),L-α-己二酸氨标准品(美国Sigma公司)、异硫氰苯酯(PITC,中国上海亭新化工试剂厂,CP)、三乙胺(北京化工厂,CP)、磷酸二氢钾(上海试剂三厂,AR)、乙酸钠(重庆北碚试剂厂,AR)、无水乙醇(广西师范学院化学试剂厂,AR)、甲醇(色谱纯,天津四友生物医学技术有限公司),乙腈(色谱,天津四友生物医学技术有限公司)。

1.6 血样测定

1.6.1 试剂配制 25 mmol/L GLN标准溶液:准确称取184.50 mg,用50 ml超纯水溶解,混匀,4 ℃冰箱保存。

2 mmol/L内标溶液:取L-a-己二酸氨标准品16.12 mg,用50 ml超纯水溶解,混匀,4 ℃冰箱保存。

样品稀释液:准确称取磷酸二氢钾355 mg,加入超纯水450 ml溶解,用10%磷酸调pH至7.40,加水至500 ml,混匀,4 ℃保存。

流动相:称取乙酸钠6.8 g,用950 ml超纯水溶解,以10%醋酸调pH至6.50,加超纯水至1 000 ml,真空抽滤后,4 ℃保存。

1.6.2 血样预处理 取全血2 ml,置干燥肝素抗凝管中,以3 000 r/min转速离心5 min。精密吸取血浆50 μl于1.5 ml离心管中,加入内标溶液20 μl,冰甲醇450 μl,涡旋混合30 s,以10 900 r/min的转速离心5 min。转移上清液于另一个离心试管中,放入真空干燥箱(60 ℃,-0.1 Mpa)真空抽干。

1.6.3 衍生反应 在真空抽干后的离心试管中加入超纯水10 μl,无水乙醇70 μl,PITC 20 μl,三乙胺10 μl。室温反应20 min,再真空抽干。加入100 μl样品稀释液,充分溶解,10 900 r/min离心3 min。

1.6.4 色谱条件 Waters SymmetryC18柱(3.9 mm×150 mm,5 μm。NO.WATO46980);流动相:50 mmol/L醋酸缓冲液(pH 6.50)-乙腈,采用梯度洗脱,具体见表1。柱温46 ℃,检测波长254 nm,洗脱时间35 min。

表1 梯度洗脱方法

Tab 1 Gradient elution programme

Time(min)	Ammonium acetate buffer(pH 6.50)	Acetonitrile	Flow rat (ml/min)
0	98	2	1.0
18	98	2	1.0
20	0	100	1.5
25	0	100	1.5
27	98	2	1.5
35	98	2	1.0

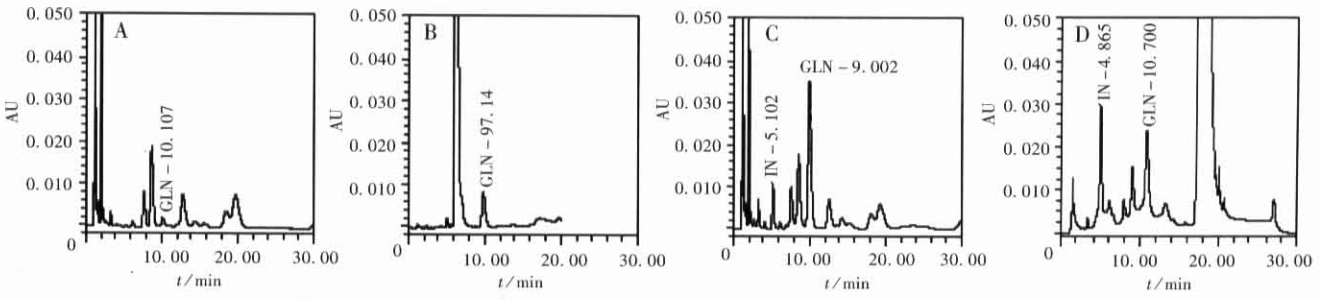
1.7 统计学处理

血药浓度经3P97程序处理,求算药代动力学参数及相对生物利用度,并对被试制剂与参比制剂的实测C_{max},梯形法计算所得AUC_{0-t}经对数转换后进行方差分析和双单侧t检验、90%可信限考察,对T_{max}进行方差分析和双单侧t检验,90%可信限考察。以此来评价被试制剂与参比制剂是否生物等效。

2 结果

2.1 分离特性

在选定的色谱条件下,测得GLN色谱图见图1。由图可见,被测物与内标物两者峰形良好,分离完全,无杂质峰干扰。GLN及内标的保留时间分别为:9.80 min和5.10 min。



A: Blank plasma; B: Glutamine standard solution; C: Glutamine standard and internal standard in blank plasma; D: Healthy volunteers and internal standard

图1 谷氨酰胺高效液相色谱图

Fig 1 Chromatogram of glutamine

2.2　线性范围和最低检测浓度

分取 50 μl 血浆 10 份于 1.5 ml 离心试管中，依次加入事先稀释好的 GLN 标准系列溶液各 20 μl，使血浆 GLN 终浓度分别为 0、14.61、29.22、58.44、87.66、116.88、146.10、292.2、438.3、584.4 μg/ml，按血样预处理及衍生反应项操作后，20 μl 注入色谱仪。测定标准物峰面积 A_S 和内标物峰面积 Ai，以 As/Ai 对浓度 Y 进行线性回归，得标准曲线回归方程如下：$Y = 1.45 \times 10^{-2} X + 2.05 \times 10^{-1}$，$r = 0.998\,2$，$n = 9$；线性范围为 14.6 ~ 584.4 μg/ml。按 3 倍信噪比计算 GLN 最低检出浓度为 14.6 μg/ml。

2.3　谷氨酰胺回收率试验

按标准曲线溶液配制方法分别配制 GLN 血浆终浓度 14.61、146.1、584.4 μg/ml 溶液各 5 份，按血样预处理方法操作并衍生后进样 20 μl 作 HPLC 分析，测定结果扣除空白值即为实测值。试验结果见表 2。

表 2　谷氨酰胺回收试验结果（$n = 5$）

Tab 2　Results of recovery tests for glutamine in human plasma（$n = 5$）

Concentration (μg/ml)	$\bar{x} \pm s$
14.61	97.39 ± 4.73
146.1	96.15 ± 5.78
584.4	101.49 ± 4.54

2.4　谷氨酰胺精密度试验

按标准曲线溶液配制方法分别配制 GLN 血浆终浓度为 14.61、146.1、584.4 μg/ml 样品各 1 份，于同 1 d 不同时间各测 5 次，考察日内变异，在 1 周内分 5 d 测定，考察日间变异。试验结果见表 3。

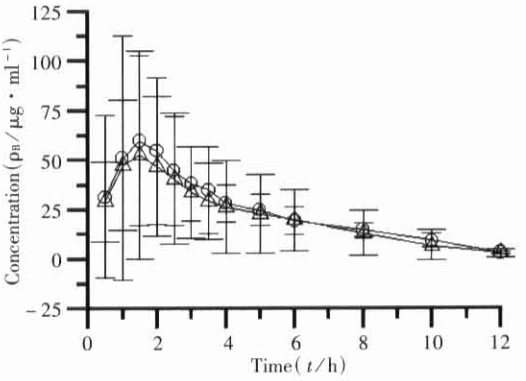
表 3　谷氨酰胺精密度试验结果（$n = 5$）

Tab 3　Results of precision tests for glutamine in human plasma（$n = 5$）

Concentration (μg/ml)	Intra-day		Inter-day	
	$\bar{x} \pm s$	RSD%	$\bar{x} \pm s$	RSD%
14.61	14.3 ± 0.3	2.1	14.67 ± 1.82	12.40
146.1	145.6 ± 2.0	1.4	144.84 ± 10.08	6.96
584.4	578.5 ± 5.7	1.0	574.99 ± 11.93	2.07

2.5　血药浓度测定结果和主要动力学参数

24 名健康受试者单次口服 1.99 g 被试制剂及参比制剂后的药一时曲线图见图 2。在未扣除服药前血浆中谷氨酰胺浓度值时，被受试制剂与参比制剂血浆中的谷氨酰胺浓度范围为 51.18 ~ 205.75 μg/ml，均在本试验的线性范围内。谷氨酰胺主要动力学参数见表 4，24 名受试者空白血浆中谷氨酰胺浓度值见表 5。



△: Test drug; ○: Reference drug

图 2　24 名健康受试者口服 1.99 g 复方谷氨酰胺被试药及参比制剂后谷氨酰胺血平均血药浓度-时间曲线（扣除空白值）

Fig 2　The average drug plasma concentration-time curve of glutamine in 24 healthy volunteers after oral administration

表 4　谷氨酰胺试验药品和参比制剂的主要动力学参数（$n = 24$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 4　Pharmacokinetic parameters for glutamine after a single oral dose reference drug and test drug（$n = 24$，$\bar{x} \pm s$）

Parameter	$T_{1/2}$ (t/h)	T_{max} (t/h)	C_{max} (ρ_B/μg·ml^{-1})	$AUC_{0\text{-}t}$ (μg·ml^{-1}·h^{-1})	$AUC_{0\text{-}inf}$ (μg·ml^{-1}·h^{-1})
Reference	2.11 ± 0.92	1.65 ± 0.63	63.83 ± 14.60	252.74 ± 59.71	262.52 ± 62.02
Test	2.14 ± 0.77	1.65 ± 0.65	71.09 ± 16.67	281.31 ± 82.61	290.44 ± 84.00

2.6　等效性判断

对 T_{max} 和经对数转换后的 C_{max}，$AUC_{0\text{-}t}$ 进行方差分析，两药差异无统计意义（$P > 0.05$）。双单侧 t 检验及 90% 可信限判断，谷氨酰胺 T_{max} 落在参比制剂的 85.7% ~ 114.3% 范围内（$P < 0.05$），C_{max} 落在参比制剂的 81.4% ~ 98.9% 范围内（$P < 0.05$），$AUC_{0\text{-}t}$ 落在参比制剂的 84.7% ~ 97.6% 范围内（$P < 0.05$），符合 SFDA 等效性判断的规定。复方谷氨酰胺颗粒剂的相对生物利用度谷氨酰胺为（93.0 ± 20.2）%。

表 5　受试者空白血浆谷氨酰胺浓度值（ρ_B/μg·ml^{-1}）

Tab 5　Glutamine concentration in blank plasma of healthy volunteers（ρ_B/μg·ml^{-1}）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Administered T	52.13	84.18	58.95	91.52	60.10	74.88	76.95	75.22	77.45	74.44	53.15	87.60	71.36	83.12	83.18	74.05	88.68	93.09	120.01	107.93	123.62	82.81	108.37	73.08
Administered R	85.46	55.57	75.04	57.00	67.39	52.70	68.53	60.65	97.23	63.08	93.73	51.18	72.89	100.85	85.68	79.82	93.89	96.01	118.82	129.90	96.87	95.13	86.35	64.25

3　讨论

血浆中谷氨酰胺含量测定，国内外早有较多报道[1~5]，其主要方法包括采用专用氨基酸分析仪和柱前衍生高效液相色谱法测定。由于专用氨基酸分析仪设备有限，应用并不普及，柱前衍生反相高效液相色谱法应用较广。在衍生反应中，主要有两种方法：一是采用 OPA（邻苯二甲醛）作衍生试剂，该法对衍生反应的条件要求较严，特别是衍生反应的时间，以 1 ~ 2 min 为宜，2 min 以后其它氨基酸的杂峰很快出现。此外，衍生产物也不稳定，衍生后必须马上进样。二是采用 PITC（异硫氰酸苯酯），较之 OPA 法，其反应时间需 20

min,但衍生产物较稳定,室温放置6 h,测定结果仍无明显差异。考虑到生物等效试验中,测定的样本量较大,特别是使用全自动进样时,一批次的样本较多,不宜采用OPA法。当采用PITC法时,血浆中多种氨基酸也同时被衍生,在色谱图中反映出有众多的内源峰,若按等度洗脱方式,血浆样品需洗脱2 h以上,才能将所有杂质洗脱完,单针洗脱时间过长、不宜大样本量分析。针对主要待测物谷氨酰胺出峰情况,为了提高分析速度,当谷氨酰胺衍生物出峰后,采用了变流动相比例及流速的梯度洗脱方式,将杂质迅速洗脱出柱子。其优点在于将分析时间由恒组分洗脱的约2.5 h缩短至35 min,其缺点是由于洗脱液的极性变化较大色谱柱柱效降低较快。实验中,应注意柱效的损失,并适时更换色谱柱。

由于谷氨酰胺是一种内源物质,血药浓度的真实值应为实测值减去服药前血浆谷氨酰胺空白值,并以此进行药代动力学参数计算。

食物中可能含有谷氨酰胺,对测定产生影响,因此,试验期间需严格控制饮食标准,使每位受试者进餐种类,进餐量及进餐时间间隔尽量保持一致,并在达峰时间之后进食。

整个试验在医护人员监控下进行,24名受试者在试验过程中均无不良反应出现。

参考文献:

[1] Matera M, Castana R, Insirello L, *et al*. Pharmacokinetic study of the relative bioavailability and bioequivalence after oral intensive or repeated short term treatment with two polyamino acid formulations[J]. Int J Clin Pharmacol Res, 1993, 13(2): 93-105.

[2] 董光龙, 王为忠, 尚刚伟, 等. 快速测定组织、血浆中谷氨酰胺及其临床意义[J]. 肠外与肠内营养, 2000, 7(2): 93-96.

[3] 肖路延, 唐志毅, 黄桂玉, 等. 谷氨酰胺高效液相测定法的研究应用[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(3): 160-162.

[4] 梁建伟, 陈 蕾, 曹丽萍, 等. 反相高效液相色谱法测定烧伤病人血浆中谷氨酰胺含量[J]. 河北医药, 2003, 25(8): 566-567.

[5] 朱明炜, 肖路延, 刘 蕾, 等. 谷氨酰胺颗粒剂在健康人体的药代动力学研究[J]. 中国临床营养杂志, 2003, 11(2): 88-91.

(编辑 张大春)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)11-1168-01

1例布加综合征患者行原位肝移植的手术配合体会

Experience in assisting operation for one case of orthotopic liver transplantation for Budd-Chiari syndrome

石明兰,李慧琼,曹颖俐,范里莉 (解放军总医院309临床部麻醉科,北京 100091)

我科为1例布加综合征患者应用体外静脉-静脉转流进行了经典式原位肝移植术,经14 h手术,取得成功。现将手术配合总结如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患者,女,43岁,反复乏力12年,腹胀、巩膜黄染2年,查体全身皮肤粘膜黄染,巩膜中度黄染,腹部略膨隆,腹壁静脉重度曲张,呈海蛇头状。磁共振血管成像检查提示:下腔静脉于肾静脉开口以上,至肝上下腔静脉右心房入口处完全闭塞,大量侧支循环建立,诊断为布加综合征、肝硬化。

1.2 手术方法

于患者上腹部肋缘下,行"人"型切口,逐层切开进入腹腔。止血后行腹腔探查。在左侧髂窝处及左腋窝切口,显露髂外静脉及腋静脉,插入体外转流管,建立体外转流。切开十二指肠韧带,结扎肝动脉,游离肝脏并切除病肝。将修好的供肝植入病人体内,用加入白蛋白的林格氏液注门静脉和肝动脉。修剪肝动脉,切开胆总管,置入并固定T管后,关闭腹腔。

1.3 手术配合

1.3.1 巡回护士配合 患者取平卧位;在患者右上肢建立外周输血通道;实施全身麻醉后,配合麻醉师进行桡动脉及锁骨下深静脉穿刺,固定各种管道,保持输液管道及动、静脉测压管通畅。保持各种仪器处于良好状态,防止断线影响手术进展。术中密切观察病情变化,准确记录出入量,认真执行医嘱,发生大出血,及时输血及各类药物。配合器械护士,随时整理、清点手术敷料、器械,严防遗漏。做好供肝修整工作,在全过程中,器官保养液的温度始终保持在1~4 ℃,并提醒修肝医生不断往器官表面铺碎冰屑,尽量减少供肝的损伤。

1.3.2 器械护士配合 选两侧带塑料口袋的手术大贴膜贴

(下转1171页)

作者简介:石明兰(1973-),女,安徽省宿松县人,护师,主要从事手术室护理等方面的研究。电话:(010)66775506

收稿日期:2004-07-01;修回日期:2004-11-21